



(19) RU (11) 2 027 434 (13) С1
(51) МПК⁶ А 61 К 31/33

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4474234/14, 16.08.1988

(46) Дата публикации: 27.01.1995

(56) Ссылки: Машковский М.Д. Лекарственные
средства. - М., 1987, ч.2, 1с.169-171.

(71) Заявитель:

Научно-исследовательский институт
трансплантологии и искусственных органов,
Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН

(72) Изобретатель: Шальнев Б.И.,

Сускова В.С., Емец В.И., Пасешиченко
В.А., Васильева И.С., Воробьев А.С.

(73) Патентообладатель:

Научно-исследовательский институт
трансплантологии и искусственных органов

(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ СРЕДСТВО

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а
именно к новому биологически активному
препарату - олигофуростанозидов из
супензионной культуры диоскореи
дельтовидной, и может найти применение для
коррекции иммунного ответа. Цель
изобретения - новый иммуномодулятор
избирательного действия, не обладающий
нефротоксическим действием. Указанная
цель достигается применением препарата

олигофуростанозидов из супензионной
культуры диоскореи дельтовидной впервые в
качестве иммуномодулятора.
Избирательность действия этого препарата
осуществляется за счет воздействия на
структурную и функцию мембран
иммунокомпетентных клеток, так как
предлагаемый препарат относится к
водорастворимым антиоксидантам
биогенного типа. 4 табл.

RU 2 027 434 C1

R U 2 0 2 7 4 3 4 C 1



(19) RU (11) 2 027 434 (13) C1

(51) Int. Cl.⁶ A 61 K 31/33

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 4474234/14, 16.08.1988

(46) Date of publication: 27.01.1995

(71) Applicant:
Nauchno-issledovatel'skij institut
transplantologii i iskusstvennykh organov,
Institut biokhimii im.A.N.Bakha RAN

(72) Inventor: Shal'nev B.I.,
Susko V.S., Emets V.I., Paseshnichenko
V.A., Vasil'eva I.S., Vorob'ev A.S.

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij institut
transplantologii i iskusstvennykh organov

(54) IMMUNOMODULATING DRUG

(57) Abstract:

FIELD: medicine, particularly, medicinal preparations used for correcting immune response. SUBSTANCE: this oligofurostanoside-based drug is prepared from suspension culture of deltoid diascorea

and employed as immunomodulator. Selective effect is produced by disclosed preparation on structure and function of membranes of immunocompetent cells. Novel drug is classed among water-soluble antioxidants of biogenic type. EFFECT: no nephrotoxic effect. 4 tbl

R U
2 0 2 7 4 3 4
C 1

R U ? 0 2 7 4 3 4 C 1

Изобретение относится к новому биологически активному препарату олигофуростанозидов из супензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной, который может найти применение в медицине, в частности для коррекции иммунного ответа.

В последние годы важное значение приобрели соединения, оказывающие иммуномодулирующее действие (угнетение или стимуляция клеточного и гуморального иммунного ответа, зависящее от дозы). Большинство из этих соединений относится к природным малотоксичным препаратам. Практическое применение из них получили левамизол, применяющийся главным образом, в иммуностимулирующем режиме, и циклоспорин А, применяющийся как иммуносупрессант. В качестве базового объекта (он же - прототип) взят циклоспорин А - новый тип иммуносупрессанта, действующий только на стадии антиген-чувствительных клеток-предшественников. Циклоспорин А допускает активацию регуляторных механизмов клеток-супрессоров, но ингибирует индукцию хелперных и цитотоксичных Т-лимфоцитов. Циклоспорин А наиболее активен при введении во время иммунизации, т.е. он действует на ранней стадии запуска лимфоцитов антигеном и это действие явно отличается от действия азатиоприна или циклофосфамида (1). Недостатком данного препарата является его нефротоксичность при использовании в терапевтических дозах (17-15 мг/кг/день при снижении к концу 1-го месяца до 6 мг/кг/день) (2,3).

У веществ, относящихся к растительным стероидным гликозидам ряда фуростана, к которым относится заявляемый препарат, иммуномодулирующая активность ранее не была обнаружена. В то же время у них известна: 1) антиоксидантная активность и 2) липотропная активность, выражаящая в гипохолестеролитическом действии.

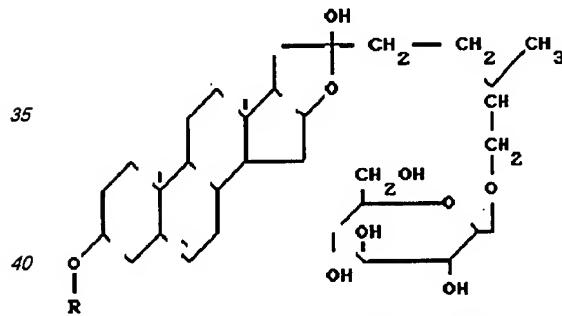
Препараты, содержащие в качестве активного начала стероидные гликозиды ряда фуростана - полиспонин и диоспонины, применяются в СССР в течение многих лет в качестве антисклеротических препаратов и представляют собой сумму олигофуростанозидов из корневищ диоскореи кавказской и диоскореи ниппонской, по составу мало отличающихся от заявляемого препарата олигофуростанозидов из супензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной.

Цель изобретения - новый иммуномодулятор избирательного действия, не обладающий нефротоксическим действием.

Указанная цель достигается применением препарата олигофуростанозидов из супензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной впервые в качестве иммуномодулятора, что соответствует критериям "новизна" и "существенные отличия". Избирательность действия этого препарата осуществляется за счет воздействия на структуру и функцию мембран иммунокомпетентных клеток, так как предлагаемый препарат относится к водорастворимым антиоксидантам биогенного типа. Его получают известным

способом (5).

Пример 1. Получение препарата олигофуростанозидов. Препарат получают из супензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Well (диоскореи дельтовидной), штамм ИФР ДМ-0,5, которую получили в Институте физиологии растений АН СССР. Биомассу для препаративного выделения препарата отбирали в стационарную фазу роста. Препарат олигофуростанозидов выделяли из этой биомассы путем осаждения с белками. Для этого клеточную массу после отделения от культуральной жидкости экстрагируют водой в соотношении 1:(10-20) в течение 2-3 ч. Осадок отделяют центрифугированием, экстракцию повторяют. К объединенной надосадочной жидкости добавляют сульфат аммония до полного насыщения и выдерживают 30 мин. При этом вместе с белками происходит соосаждение низкомолекулярных гликозидов. Полученный осадок обрабатывают 5-6 раз 96% этанолом, осадок отделяют, промывают этанолом. Надосадочную жидкость упаривают в роторном испарителе. В осадке получают препарат олигофуростанозидов, который состоит из двух гликозидов: 1) протодиосцина (26-0-β-D-глюкопиранозил-22-окси-фурост-5-ен-3β, 26-диол 3-0-β-дакотриозид) и 2) дельтозида (26-0-β-D-глюкопиранозил-22-окси-фурост-5-en-3 β, 26-диол 3-0-β-дельтотриозид). Общая формула препарата



где R для 1) равно 1 молекуле глюкозы и 2 молекулам рамнозы и для 2) R равно 2 молекулам глюкозы и 1 молекуле рамнозы.

Количественный анализ выделенного препарата проводили с помощью спектрометрического метода, основанного на цветной реакции олигофуростанозидов с реагентом Эрлиха - 1%-ный раствор п-диметиламинонензальдегида в смеси метанол: соляная кислота (концентрированная 66:34%). Чистота полученного препарата 80%. Методом жидкостной хроматографии с 25%-ным ацетонитрилом в качестве подвижной фазы с детектированием при 207 нм в составе препарата нашли следующее соотношение между дельтозидом и протодиосцином 10:16. Препарата представляет собой белый, аморфный порошок, растворимый в воде. Стабилен при хранении при +20°C в закрытой склянке.

Иммуномодулирующий эффект препарата и избирательное действие на иммунокомпетентные клетки и иммунорегуляторные их субпопуляции изучены в тестах *in vitro* (примеры 2-4). Предварительно было изучено

цитотоксическое действие препарата на лимфоциты периферической крови человека при культивировании их в течение 72 ч в присутствии препарата в концентрациях от 0,1 до 100 мкг/мл. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью трипанового синего. Процент живых клеток составлял 85-90%, что соответствовало контрольным (без препарата культурам, 10-15% составляла естественная гибель клеток. Таким образом, было показано, что испытуемый препарат в исследованных концентрациях не токсичен.

П р и м е р 2. Влияние препарата олигофуростанозидов на Т-хеллеры изучено в реакции бласттрансформации лимфоцитов, индуцированных ФГА. При этом мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной крови дифференциальным центрифугированием на градиенте плотности фиколл-гипака ($\rho=1.077$) по Вонум. При постановке реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) лимфоциты в количестве $0,25\text{-}0,50 \times 10^6$ инкубировали в 1 мл среды 199, содержащей 10% сыворотки АВ (IV) группы и 5 мкг ФГА-Р (фирмы "Serva"). В момент постановки культуры до ФГА в опытные пробирки вносили испытуемый препарат в концентрациях от 0,01 до 100 мкг/мл. Пролиферативный ответ лимфоцитов оценивали через 72 ч, причем за 4 ч до окончания культивирования клеток в культуру вносили ^{3}H -тимидин в концентрации 0,04 МБК (1 мкюри) на 1 мл культуры. Через 72 ч от начала культивирования каждую пробу переносили на миллипоровые фильтры, отмывали холодным 10%-ным раствором ТХУ и физраствором. Радиоактивность подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Результаты выражали в индексе стимуляции, который высчитывали по формуле

$$\text{ИС} = \frac{\text{имп}/\text{мин опытных культур}}{\text{имп}/\text{мин контрольных культур}}$$

Результаты представлены в табл.1.

Как видно, действие препарата зависело от концентрации, вызывая либо стимуляцию, либо супрессию пролиферативного ответа лимфоцитов на митогенный стимул ФГА. Наибольший стимулирующий эффект препарата олигофуростанозидов выражен в концентрации от 0,01 до 0,10 мкг/мл (в 1,5 раза эффект выше по сравнению с контролем). Препарат в концентрации от 1,0 до 100 мкг/мл оказывал ингибирующий эффект лимфоцитов, индуцированный ФГА, вплоть до полного исчезновения ответа. Циклоспорин А, взятый в качестве тест-препарата, с выраженным иммуносупрессивным действием, в аналогичных концентрациях ингибировал функцию Т-лимфоцитов в teste РБТЛ.

Как было показано, РБТЛ, индуцированная ФГА, является моделью активации Т-хеллеров. Таким образом, исследованный препарат оказывал зависимый от дозы иммуномодулированный (стимулирующий или ингибирующий) эффект на активность Т-хеллеров в teste бласттрансформации, индуцированной ФГА.

П р и м е р 3. Влияние препарата олигофуростанозидов на активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) оценивали, используя в качестве мишенией

перевиваемую миелоидную линию K562 человека, которая по многочисленным работам определяется как высоко чувствительная мишень в цитотоксическом teste. Клетки, тестируемые на активность спонтанных киллеров, получены от здоровых доноров. Перевиваемые линии K562 и постановку цитотоксического теста осуществляли по методу Зарецкой Ю.М. Данные экспериментов представлены в табл.2.

Как видно из табл.2, спонтанный лизис (выход СЧ⁵¹) в среднем составлял 31%. Уровень активности спонтанных киллеров в контроле без препарата составлял $55 \pm 4\%$. На клетки-мишени исследуемый препарат не оказывал токсического эффекта. Лизис клеток K562, обработанных разными дозами препарата, не превышал уровня спонтанного лизиса этих клеток. Средний показатель активности ЕКК после обработки их препаратором олигофуростанозидов в дозе от 0,1 до 10,0 мкг/мл не отличался от контроля.

Таким образом, исследованный препарат в диапазоне доз от 0,1 до 10,0 мкг/мл не оказывал влияния на активность естественных (спонтанных) клеток-киллеров, также как и контрольный препарат - циклоспорин А.

П р и м е р 4. Проводилась также оценка влияния препарата олигофуростанозидов на генерацию и активность Кон-А-Т-супрессоров. Активацию клеток-супрессоров проводили по методу Shou L с соавт. Лимфоциты донора инкубировали в 1 мл среды RPMI 1640 в отсутствии (контроль 1 - спонтанные супрессоры) или в присутствии 60 мкг/мл Клин-А (контроль 2 - индуцированные Т-супрессоры) в течение 48 ч при 37°C. Затем клетки обрабатывали митомицином С, чтобы ингибировать синтез ДНК, и трижды отмывали средой RPMI 1640. К $0,5 \times 10^6$ клеток, проинкубированных с Кон-А (или без него), добавляли $0,5 \times 10^6$ аллогенных лимфоцитов и 5 мкг/мл ФГА фирмы "Serva" (тест-систему). Клетки инкубировали 72 ч, за 4 ч до конца культивирования добавляли ^{3}H -тимидин. Результаты рассчитывали по формуле:

$$(1 - \frac{P}{K}) \times 100\% \text{ где } P - \text{число имп/мин в}$$

опытных культурах с Кон-А, К-то же в культурах без Кон-А. Испытуемый препарат добавляли в инкубационные среды с Кон-А в концентрациях 0,1, 1,0, 10,0, 100,0 мкг/мл и инкубировали 48 ч при 37°C - для оценки влияния их на генерацию Кон-А индуцированных Т-супрессоров. Все эксперименты проводили дважды по 3-5 параллелей в каждом опыте. Данные представлены в табл.3.

Как видно из табл.3, уровень бласттрансформации тест-клеток при добавлении к ним лимфоцитов, инкубированных 48 ч при 37°C без Кон-А (контроль 1), за счет индукции спонтанных Т-супрессоров, составил 80% уровня бласттрансформации клеток, стимулированных ФГА, который принят за 100% (контроль). Внесение в тест-систему клеток, инкубированных с Кон-А, приводило к снижению уровня бласттрансформации до 20% от контроля за счет ингибирующего действия индуцированных

Кон-А-Т-супрессоров (контроль 2). Культивирование лимфоцитов в присутствии препарата олигофуростанозидов и Кон-А в течение 48 ч при 37°C и внесение их после отмыки в тест-систему угнетало бласттрансформацию тест-клеток практически до спонтанного уровня (5-10%). Это может быть следствием увеличения количества индуцированных Кон-А-Т-супрессоров за счет стимулирующего влияния исследуемого препарата на их генерацию. Циклоспорин А в дозах от 0,1 до 10,0 мкг/мл не оказывал влияния на Т-супрессоры (% % бласттрасформации остается на уровне контроля 2), доза 100,0 мкг/мл является для циклоспорина А цитотоксической, поэтому % бласттрансформации снижен до 10%.

Были также проведены эксперименты по изучению влияния предлагаемого препарата по сравнению с известным иммуномодулятором левамизолом на формирование гиперчувствительности замедленного типа у мышей после иммунизации их эритроцитами барана (пример 5). Влияние препарата олигофуростанозидов на формирование ГЗТ у мышей.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) является типичной моделью клеточно-опосредованных иммунных реакций *ин виво*, которые играют центральную роль в отторжении аллотрансплантата, резистентности к злокачественным опухолям и инфекции.

Воздействуя препаратом до или после сенсибилизации антигеном и оценивая степень проявления РГЗТ, определяли не только на какую из фаз иммунного ответа - индуктивную (до антигенного стимула) или продуктивную (после антигена), в большей степени оказывает действие препарат, но и оценивали чувствительность к нему различных субпопуляций Т-лимфоцитов, вовлеченных в РГЗТ. В качестве сенсибилизирующего антигена использовали эритроциты барана (ЭБ) у мышей. РГЗТ и ЭБ оценивали по разнице веса контрольной и опытной (после введения разрешающей дозы антигена) лапок.

Изучение влияния нового препарата олигофуростанозидов на формирование реакции ГЗТ у мышей к ЭБ проводили при введении препарата по схемам: за 2 дня до иммунизации, за 1 день до иммунизации и в день иммунизации (-2,-1,0 дни) (влияние на пре-Т-супрессоры) и по схеме: в день иммунизации и на 1 и 2 сут после иммунизации (0,+1,+2 дни) (влияние на Т_{гзт}-эффекторы). Данные представлены в табл.4.

Дозы препаратов выбирались

пропорционально терапевтическим дозам препаратов (для препарата олигофуростанозидов учитывалась терапевтическая доза для полиспоннина).

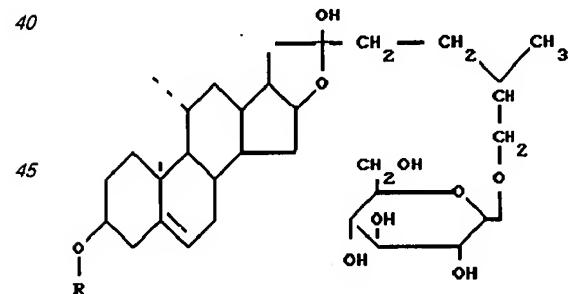
Результаты эксперимента показали, что в исследованных дозах препарат олигофуростанозидов оказывает преимущественное влияние на зрелые Т_{гзт}-эффекторы (при введении препарата по второй схеме). Эффект статистически достоверен. Циклоспорин А - прототип - не оказывает влияния на Т_{гзт}-эффекторы (другой механизм действия). Левамизол - аналог - оказывает действие как на пре-Т-супрессоры, так и на зрелые Т_{гзт}-эффекторы при обоих схемах введения, 6-меркаптогуридин (контроль к левамизолу) не оказывает влияния ни на клетки-предшественники (при введении по 1 схеме ни на Т_{гзт}-эффекторы (при введении по второй схеме)). Полученные результаты показывают, что по механизму действия заявляемый препарат отличается от механизма действия циклоспорина А (прототип). Наиболее вероятно, что его действие в используемой дозе связано со стимуляцией Т-супрессорной активности.

Таким образом, в трех тестах клеточного иммунитета *ин витро* и в teste РГЗТ *ин виво* показано иммуномодулирующее действие препарата олигофуростанозидов, выделенного из суспензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной, относящемуся к классу стероидных гликозидов и обладающих антиоксидантным действием, зависящее от дозы и схемы введения относительно антигенного стимула.

Формула изобретения:

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ СРЕДСТВО.

Применение препарата олигофуростанозидов из суспензионной культуры диоскореи дельтовидной, содержащего протодиосцин и дельтозид общей формулы



где R для протодиосцина равно одной молекуле глюкозы и двум молекулам рамнозы, а для дельтозида - двум молекулам глюкозы и одной рамнозы,

в качестве иммуномодулирующего средства.

Таблица 1

Влияние препарата олигофуростанозидов на бласттрансформацию лимфоцитов, индуцированную ФГА

Условие опыта	Доза в мкг/мл	Включение ^{3}H -тимицина имп/мин	Индекс стимуляции	Примечание
Контроль спонтанный без ФГА МНК= $2,5 \times 10^5$		505 (253-910)		
Контроль стимулированный ФГА (5 мкг/мл) МНК= $2,5 \times 10^5$		5716 (3700-8569)	11	
Олигофуростанозид МНК= $2,5 \times 10^5$ + препарат + ФГА 5 мкг/мл	0,01 0,10 1,00 10,0 100,0	9311 \pm 870 6496 \pm 631 3225 \pm 311 3268 \pm 330 677 \pm 64	18 13 7 7 0,1	Стимуляция Стимуляция/нет эффекта Супрессия Супрессия Полная супрессия
Циклоспорин А МНК= $2,5 \times 10^5$ + препарат + ФГА 5 мкг/мл	0,01 0,10 1,00 10,0 100,0	3273 \pm 323 1804 \pm 178 860 \pm 84 488 \pm 45 250 \pm 23	7 3,5 1,5 1,0 0,5	Супрессия Супрессия Супрессия Полная супрессия Полная супрессия

15

Таблица 2

Влияние препарата олигофуростанозидов на активность спонтанных (естественных) киллеров

Условия опыта	Доза в мкг/мл	Влияние препарата на клетки-мишени % лизиса	Литическая активность спонтанных киллеров % лизиса клеток-мишеней
Контроль Спонтанный лизис клеток-мишеней K562		31 \pm 3	
Контроль Клетки-мишени K562+лимфоциты донора			55 \pm 4
Препарат олигофуростанозидов	0,10 1,00 10,00	33 \pm 2 30 \pm 2 32 \pm 3	50 \pm 4 52 \pm 5 51 \pm 5
Циклоспорин А	0,10 1,00 10,00	36 \pm 4 31 \pm 3 31 \pm 4	51 \pm 4 53 \pm 4 53 \pm 5

RU 2027434 C1

RU 2027434 C1

Таблица 3

Влияние препарата олигофуростанозидов на Т-супрессорный эффект, индуцированный Кон-А

Серия опыты	Условия инкубации	Дозы препарата, мкг/мл	Включено ^{3}H -тимидина	
			имп/мин	%
1	$0,5 \times 10^6$ МНК-72 ч при 37°C-тест-клетки	-	560 \pm 40	Спонтанный уровень \sim 5%
2	$0,5 \times 10^6$ МНК+ФГА-72 ч при 37°C-тест-система	-	12251 \pm 105	100%
3	$0,5 \times 10^6$ МНК+ФГА-48 ч при 37°C-контроль 1	-	9750 \pm 90	80%
4	$0,5 \times 10^6$ МНК+ФГА+ Кон-А-Т-супрессоры-48 ч при 37°C-контроль 2	-	2516 \pm 21	20%
5	$0,5 \times 10^6$ МНК+ФГА+ +Кон-А-Т-супрессоры+ +олигофуростанозид- 48 ч при 37°C	0,10 1,0 10,0 100,0	884 \pm 7 1104 \pm 10 755 \pm 7 766 \pm 8	Близко к спон-тенному уров-ню 5-10%
6	$0,5 \times 10^6$ МНК+ФГА+ +Кон-А-Т-супрессо-ры+циклоспорин А- 48 ч при 37°C	0,1 1,0 10,0 100,0	2722 \pm 25 2786 \pm 27 2231 \pm 20 1323 \pm 12	20% 10%

Таблица 4

Влияние препарата олигофуростанозидов на формирование РГЭТ у мышей

Препарат	Доза, мг/кг веса тела	Разница массы опытной и контрольной лапок, мг			
		Схема-2,-1,0 дни	P	Схема-0,+1,+2 дни	P
Контроль	-	34,0 \pm 2,5	-	35,0 \pm 1,7	-
Препарат оли-гофуростано-зидов	100	31,0 \pm 1,2	P ₁₋₂ <0,05	21,5 \pm 2,0	P ₁₋₂ <0,05
Циклоспорин	50	33,5 \pm 2,3	P ₁₋₃ >0,05	32,0 \pm 1,9	P ₁₋₃ >0,05
Левамизол	25	26,5 \pm 1,9	P ₁₋₄ <0,05	26,5 \pm 1,9	P ₁₋₄ <0,05
6-меркаптопу-рин	100	34,0 \pm 1,7	P ₁₋₅ >0,05	31,0 \pm 1,3	P ₁₋₅ >0,05

RU 2027434 C1

RU 2027434 C1